

**Génexpressziós változások vizsgálata a gyors szívingerléssel kiváltott prekondicionálás
késői szakaszában kutya modellen**

A doktori értekezés tézisei

Kovács Mária

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája

című Doktori Program



témavezető: Prof. Dr. Végh Ágnes

SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2013

A disszertáció alapját képező közlemények:

1. Kovács M, Papp R, Varga-Orvos Z, Ménesi D, Puskás LG, Végh A. Changes in gene expression following cardiac pacing-induced delayed cardioprotection in the canine heart. *Acta Biol Hung* 61:434-48. 2010
2. Kovács M, Gönczi M, Kovács E, Végh Á. Time course analysis of cardiac pacing-induced gene expression changes in the canine heart. *Mol Cell Biochem*. 372(1-2):257-66. 2013

Egyéb közlemények

1. Tiwari V, Oh MJ, Kovacs M, Shukla SY, Valyi-Nagy T, Shukla D. Role for nectin-1 in herpes simplex virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS J*. Nov;275(21):5272-85. 2008
2. Akhtar J, Tiwari V, Oh MJ, Kovacs M, Jani A, Kovacs SK, Valyi-Nagy T, Shukla D. HVEM and nectin-1 are the major mediators of herpes simplex virus 1 (HSV-1) entry into human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Sep;49(9):4026-35. 2008
3. Kavouras JH, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, Shukla D, Valyi-Nagy T. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *J Neurovirol*. Oct;13(5):416-25. 2007
4. O'Donnell CD, Kovacs M, Akhtar J, Valyi-Nagy T, Shukla D. Expanding the role of 3-O sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus type-1 entry. *Virology*. 397(2):389-98. 2010
5. Papp R, Gönczi M, Kovács M, Seprényi Gy, Végh Á. Gap junctional uncoupling plays a trigger role in the antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning. *Cardiovascular Research*, 74(3): 396-405. 2007
6. Gönczi M, Papp R, Kovacs M, Seprényi Gy, Végh A. Modulation of gap junctions by nitric oxide contributes to the anti-arrhythmic effect of sodium nitroprusside? *Br J Pharmacol* 156(5):786-93. 2009

7. Juhász L, Kiss A, Nyese E, Kovács M, Seprényi G, Kaszaki J, Végh A. Is there a trigger role of peroxynitrite in the anti-arrhythmic effect of ischaemic preconditioning and peroxynitrite infusion? Eur J Pharmacol. 30;667(1-3):306-13. 2011

8. Gönczi M, Kovács M, Seprényi G, Végh A. The involvement of gap junctions in the delayed phase of the protection induced by cardiac pacing in dogs. Clin Sci (Lond). 123(1):39-51. 2012

A doktori disszertáció összefoglalójában szereplő rövidítések:

Cx43: connexin43kDa,

iNOS: indukálható,

eNOS: endoteliális,

nNOS: neuronális NO szintáz

Bcl2: B-cell CLL/lymphoma 2,

BAX: BCL2-associated X protein,

casp3: caspase-3 apoptosis-related cysteine peptidase,

casp9: caspase 9 apoptosis-related cysteine peptidase,

HSP70: hősokk protein 70 kDa,

PKC α és **PKC ϵ** : protein kináz C alfa és epszilon izoforma,

GSK3 β : glikogén szintáz kináz 3 beta,

ERK1,2: extracellular signal-regulated kinase 1,2,

sGC α 3 és **sGC β 3:** guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 and beta 3,

sGC α 2: guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2,

RT-PCR: real time polymerase chain reaction (valós idejű PCR),

Bevezető

Az iszkémiás prekondicionálás (PC) egy olyan endogén kardioprotektív folyamat, amely során rövid, nem letális iszkémiás periódusokkal védőhatás váltható ki egy hosszabb, letális iszkémia/reperfúzió káros hatásaival szemben (1). Korábbi kísérleteink igazolták, hogy a PC nemcsak a miokardiális iszkémia okozta sejtpusztulást csökkenti, valamint a szívfunkció romlását mérsékli, hanem jelentős antiaritmiás hatással is rendelkezik (2). Továbbá kutatócsoportunk mutatta ki altatott kutya modellen, hogy az iszkémia/reperfúzió során megjelenő aritmiák száma és súlyossága is jelentősen csökkenthető, ha a koszorúér okklúziót megelőzően négyszer öt percen keresztül gyors kamrai szívingerlést hajtanak végre (3).

A prekondicionáló védőhatás két, egymástól jól elkülöníthető fázisban jelenik meg. Az un. korai fázis közvetlenül a prekondicionáló stimulust követően alakul ki, és hatása egy-két órán belül megszűnik. A védőhatás azonban 20-24 óra múlva újra megjelenik, és ezt a második fázist késői védőhatásnak nevezzük (4). Mivel a prekondicionálás jelentős védőhatást biztosít az akut iszkémia/reperfúzió okozta súlyos, gyakran hirtelen szívhalált okozó kamrai aritmiákkal szemben, ezért a doktori disszertáció célja, hogy megismerjük azokat a háttérfolyamatokat, melyek a késői védőhatás kialakulásához vezetnek elősegítve ezzel újabb antiaritmiás szerek fejlesztésének lehetőségét.

Az irodalmi eredmények alapján ismert, hogy az iszkémiás PC korai fázisának kialakulásában olyan, a prekondicionálás hatására felszabaduló endogén anyagok vesznek részt, mint pl. az adenozin (5), bradikinin (6) vagy a nitrogén monoxid (7). Ezek az endogén anyagok főként G-protein kapcsolt receptoraikhoz kapcsolódva, különböző jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül alakítják ki a védőhatást. Ilyen jelátviteli útvonal pl. a PI3K-Akt-eNOS-NO-sGC-PKG, a PI3K-Akt-ERK, a PI3K-Akt-GSK3 β vagy a PI3K-Akt-BAD/caspase9 kapcsolt szignalizáció, amelyek egyúttal a késői védőhatás kialakulásáért felelős gének expresszióját okozzák.

Az NO korai védőhatás kialakulásában betöltött központi szerepét számos tanulmány bizonyította. Az NO számos hatása mellett transzkripciós változásokat is okoz, mint pl. az iNOS gén expressziójának indukciója, amely a késői fázis kialakításában szintén fontos szerepet játszó NO képződését is biztosítja. Az NO szintézisét végző enzimek génjein kívül számos egyéb, a késői védőhatásban fontos szerepet játszó génexpressziós változást is azonosítottak.

Legjellemzőbb ezek közül például az antioxidáns védelemért felelős MnSOD, CAT fehérjék expressziójának fokozódása, valamint az iszkémiás károsodás során fellépő sejtpusztulást megakadályozó anti-apoptotikus gének (pl. Bcl2) transzkripciójának fokozódása, és az apoptotikus gének expressziójának csökkenése (pl. BAX, BAK) (8,9).

Célkitűzések

Mivel a gyors szívingerléssel kiváltott késői PC molekuláris háttérfolyamatai kevésbé ismertek, a dolgozat egyik célkitűzése, hogy megvizsgáljuk, hogy ez a típusú prekondicionáló inger milyen génexpressziós mintázatokat hoz létre. Megvizsgáltuk néhány olyan gén expresszióját is, melyek szerepe ugyan ismert az iszkémiás PC-vel indukált védőhatásban, de pontos szabályozásuk és szerepük nem tisztázott a gyors szívingerléssel kiváltott késői védőhatásban. Ehhez a vizsgálathoz 45 gént választottunk ki, amelyeket a védőhatás kialakításában betöltött funkciójuk alapján különböző csoportokba soroltunk (pl. antioxidáns fehérjék, apoptotikus/anti-apoptotikus faktorokat kódoló, NO termelésért felelős valamint jelátviteli folyamatokban részt vevő gének).

Munkánk második fő célja volt, hogy a fentebb felsorolt gének expressziójának időfüggését is vizsgáljuk, ugyanis ezen gének a prekondicionáló stimulust követő időbeli változása a késői védőhatás megjelenéséig nem ismert. Ezért kísérleteinkben a génexpressziós mintázatot a gyors szívingerlést követő négy időpontban vizsgáltuk; közvetlen utána (0 óra) valamint 6, 12 és 24 óra múlva. A két fő célkiűzés megvalósításához kísérleteinket két kivitelezési csoportba rendeztük:

I. Gyors szívingerléssel kiváltott késői védőhatás során kialakuló génexpressziós változások vizsgálata kutya szívizomban cDNS mikrochip ill. valós idejű PCR módszerekkel.

II. Gyors szívingerlést követő génexpressziós változások időfüggésének vizsgálata négy időpontban valós idejű PCR-al. Továbbá az transzkripciós vizsgálatokat fehérje szintű mérésekkel is kiegészítettük, a korai és a késői védőhatás kialakításában egyaránt központi szerepet játszó, NO termelésért felelős enzim, az eNOS esetében.

Módszerek

1. Műtéti eljárás

Kísérleteinket mindkét nemhez tartozó keverék kutyákon végeztük. Az állatokat pentobarbitállal (30 mg/kg i.v.) altattuk, az altatást később kloralóz és uretán keverékével tartottuk fenn (60 ill. 200 mg/kg i.v.). Az első napon a gyors kamrai szívingerlést a jobb kamrába vezetett elektródán keresztül hajtottuk végre, négyszer öt percen keresztül 240 ütés/perc frekvenciával, öt perces szünetekkel megszakítva majd 24 óra múlva a mellkas és a szívburok megnyitása után a bal koronária artéria elülső leszálló ágát (LAD) későbbi 25 perces okklúzió céljára kipreparáltuk.

2. Kísérletes csoportok

I. Az álműtött kontroll (K, n=3) és az iszkémiás kontroll (IC, n=3) csoportba tartozó állatokban az altatást, ill. műtéti beavatkozást követően, elektródát vezettünk a jobb kamrába, de szívingerlés nem történt. Az IC csoportban 24 óra elteltével 25 perces iszkémiát idéztünk elő a LAD leszorításával, az álműtött kontroll csoportban nem történt okklúzió. További négy állatnál (PC csoport, n=4) a jobb kamrába vezetett elektródon keresztül gyors kamrai szívingerlést végeztünk. Ezt követően 24 óra múlva szintén 25 perces LAD okklúzió történt. A kísérletek végén a LAD területéről szívizomszöveti mintákat vettünk ki, majd ezeket folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, ill. későbbi felhasználásig -80 fokon tároltuk.

II. További 12 kísérletes állatnál a szívingerlő elektród bevezetését követően gyors szívingerlést alkalmaztunk. Négy csoportot alakítottunk ki, csoportonként három-három állattal aszerint, hogy a gyors szívingerlést követően mely időpontban történt a mintavételezés: közvetlen utána (0óra), 6, 12 vagy 24 óra múlva. Ezen kívül további 12 állat felhasználásával olyan kontroll csoportokat alakítottunk ki, melyeknél a fentihez hasonló módon és időpontokban végeztük el a műtéti eljárást, de gyors szívingerlés nem történt. A kísérletek végén történő mintavételezés megegyezett a 2/I-es pontnál leírtakkal.

3. Génexpressziós változások vizsgálata

A gyors szívingerléssel kiváltott késői PC során azonosítandó gének expresszióját cDNS mikrochip analízissel vizsgáltuk, melyhez 3200 human cDNS-t tartalmazó mikrochipet használtunk fel, valamint Cy3 és Cy5 fluoreszcensen jelölt próbákat a három kísérleti csoportból (K, IC és PC). A mikrochip analízissel kapott eredményeket RT-PCR technikával igazoltuk vissza.

4. Valós idejű PCR vizsgálat (RT-PCR)

A gyors szívingerléssel kiváltott késői PC csoportban valamint a gyors szívingerlés okozta génexpressziós változások időfüggését RT-PCR technika segítségével vizsgáltuk. Az RT-PCR reakciókat génspecifikus primerek és SYBRGreen protokoll felhasználásával ABI-Prism7000-es készüléken végeztük el. Minden RT-PCR reakciót háromszor ismételtünk, génenként két-két párhuzamossal. A RT-PCR futásokat HPRT és tubulin háztartási génekre normalizáltuk. A végső relatív génexpressziós változásokat delta-delta Ct módszer segítségével számoltuk ki és az álműtött vagy az iszkémiás kontrollhoz képest ún. génexpressziós arányként határoztuk meg. Az eredmények kiértékelésénél a 0.5-1.5 között történt változásokat nem tekintettük jelentős eltérésnek a kontrollhoz képest. Azokat a relatív génexpressziós változásokat, melyeket 0.5 alatt ill. 1.5 fölött kaptunk, jelentős változásnak, előbbi esetében csökkent utóbbinál emelkedett génexpressziós változásnak tekintettük a kontrollhoz képest.

5. Western blot analízis

A különböző kísérletes csoportokból kivett szívizomszöveti mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig -80 fokon tároltuk. A mintákat folyékony nitrogénben porítottuk, majd 65-75 mg szívport felhasználva a total protein frakciót izoláltuk, amelyben mind a citoplazmatikus mind a membrán fehérjék megtalálhatóak. Az izolátumok fehérjetartalmát Lowry-módszerrel határoztuk meg, majd 100 µg fehérjét futtattunk meg 8%-os poliakrilamid gélen és blottoltuk át PVDF membránra. A membrán 5 %-os tejjel történő blokkolása után a kétféle elsődleges antitesttel egy éjszakán keresztül 4 fokon míg a másodlagos antitesttel 1 órán keresztül szobahőmérsékleten jelöltünk. A két elsődleges antitest közül az egyik a teljes eNOS

enzimet felismerő nyúl poliklonális anti-eNOS volt, míg a másik egy egér monoklonális antitest, mely az Akt (vagy más néven PKB) szignalizáció eredményeként megvalósuló foszforilációt és egyben az aktiválódott eNOS enzimet ismeri fel specifikusan. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-nyúl ill. anti-egér típusú antitesteket használtunk fel, majd az ECL Plus kittel előhívott membránok kemilumineszcens jelét röntgen film segítségével hívtuk elő. Az eNOS és az aktiválódott eNOS jelek intenzitását ImageJ program segítségével számszerűsítettük, majd a röntgen filmen kapott jeleket legnagyobb értékre normalizáltuk az összehasonlíthatóság érdekében.

Eredmények

I. A késői prekonkondicionálás hatása a génexpressziós változásokra kutya szívizomban

A gyors szívingerléssel kialakított késői védőhatásra kialakuló transzkripciós változásokat 3200 cDNS-t tartalmazó mikrochipen követtük nyomon az álműtött és az iszkémiás kontroll csoportokhoz viszonyítva. A gyors szívingerlést követően 22 gén mutatott változást (19 gén transzkripciója nőtt, 3 gén expressziója csökkent), míg összesen 10 gén expressziója változott a 25 perces iszkémia után (5 gén transzkripciója nőtt, 5 gén transzkripciója csökkent). Elsősorban jelátviteli utakhoz tartozó gének valamint hormon receptorokat, metabolikus enzimeket és ioncsatornákat kódoló gének transzkripciója változott szignifikánsan a kontrollokhoz képest. Ezek közül kiemelendő, hogy a MEF2A-t és TGFB2-t kódoló gének expressziója nőtt, míg a VR1, VR2 fehérjéket kódoló gének aktivitása pedig csökkent a gyors szívingerléssel kiváltott késői PC során.

A kísérletek második felében RT-PCR-t használtunk 45 gén akut iszkémia után, ill. késői PC hatására bekövetkezett változásainak tanulmányozására. Ezeket a géneket funkció szerint csoportosítottuk, mint például réskapcsolatok felépítésében részt vevő fehérjéket, NO-ot termelő enzimeket, anti-apoptotikus/apoptotikus fehérjéket, hősokk proteineket és jelátviteli utokban szereplő kinázokat kódoló gének. A 45 vizsgált gén közül, 23 transzkripciója változott akut iszkémia hatására; 17 mutatott magasabb expressziót és 6 alacsonyabbat az átműtött kontrollhoz képest. Ezen gének kifejeződése a késői PC csoportban vagy ellentétesen irányban változott (12 gén esetében), vagy kontroll szintre állt vissza (9 gén) az iszkémiás állapothoz képest. Ezek közül

kiemelendő, hogy az nNOS, HSP70, PKC α , JNK1, GSK3 α , GYS1, BDKRB1 kódoló gének növekedett expressziót mutattak a késői PC csoportban, míg a BAK, Casp3 transzkripciója csökkent az iszkémiás csoporthoz képest.

II./1. Génexpressziós változások időfüggésének vizsgálata gyors szívingerlést követően

A kísérletsorozat második felében az I-es pontban felsorolt gének aktivitásának változásait vizsgáltuk a gyors szívingerlést követő négy időpontnál; közvetlenül a szívingerlést követően (0 óra) ill. 6, 12 és 24 óra múlva RT-PCR technikával. A közvetlen korai időpontnál (0 óra) 8 gén (HSP90, MnSOD, Bcl-2, PKC ϵ , ERK1, sGC α 3, sGC β 3, sGC α 2) mutatott aktiválódást, míg 6 repressziót a kontrollhoz képest (pl. caspase3 and caspase9, GSK3 β). Ezek a korai változások változatlanul maradtak a későbbi időpontok alatt is (mint pl. MnSOD, PKC ϵ , casp3, casp9, GSK3 β esetében) vagy kétfázisú változást mutattak, azaz kb. 6 óránál kontroll szintre álltak vissza, de 12 vagy 24 óránál újra növekedett a gének aktivitása (mint pl. HSP90, ERK1, Bcl2, sGC).

Voltak olyan gének is, melyek csak későbbi időpontoknál mutattak szignifikáns változást, mint pl. az eNOS, iNOS ill. Cx43-at kódoló fehérjék génjei. Az NO termelésért felelős két különböző enzim génjei (eNOS, iNOS) 12 óránál mutattak fokozott expressziót, míg a Cx43 szintézisért felelős gén 6 óránál csökkent majd 12 óránál fokozott aktivitást mutatott a kontrollhoz képest.

II./2. A gyors szívingerléssel indukált transzkripciós változásokat fehérje szintű mérésekkel is kiegészítettük az eNOS esetében, mert ez az NO termelésért felelős enzim mind a korai mind a késői védőhatás kialakulásában feltehetően központi szerepet játszik.

A western blot eredmények alapján az eNOS fehérje mennyisége nem változott az első három időpontnál, de jelentősen növekedett 24 órával a gyors szívingerlést követően. Ezzel ellentétben az eNOS enzimatis aktivitása már korábbi időpontban, közvetlenül a szívingerlés után megemelkedett, amely 6 óránál ill. 12 óránál kontroll szintre állt vissza, de 24 óra elteltével újra aktiválódott.

Értékelés

A cDNS mikrochip technika alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy egyszerre több ezer gén kifejeződését vizsgáljuk egy időben. Ezért ez a módszer különösen alkalmas arra, hogy olyan komplex, több gén kifejeződését befolyásoló jelenséget vizsgálhassunk, mint a prekondicionálás (10). cDNS mikrochip technikával több olyan gént sikerült azonosítanunk, melyek szerepe eddig nem volt ismert a késői PC-ben, ezek közé tartoznak például az angiogenezisért felelős transzkripciós faktorok (MEF2, TGFB2), mely alátámasztja azt a feltevést miszerint a prekondicionálás hatására angiogenezis történik a VEGF útvonalon keresztül. Szintén cDNS mikrochippel azonosított gén, a a cAMP lebontását végző PDE4D9 típusú foszfodiészteráz, mely további bizonyítékot nyújt arra, hogy a prekondicionálás nemcsak növeli a foszfodiészterázok aktivitását, hanem azok transzkripcióját is fokozza. A VR1 ill. VR2 vazopresszin receptorokat kódoló gének expressziója viszont csökkent szívingerlés hatására; ezen fehérjék szerepe eddig nem volt ismert a PC késői védőhatásában.

A kísérletek második felében RT-PCR-t használtunk olyan gének vizsgálatára, melyek funkciója ismert és igazolt az iszkémás PC korai védőhatás kiváltásában, viszont szerepük nem tisztázott a gyors szívingerlést követő késői védőhatásban. Különböző állatmodellekben igazolták, hogy az iszkémiás PC fokozza az anti-apoptotikus hatásért felelős Bcl2 expressziót, míg csökkenti az apoptotikus BAX, BAK, Casp3, Casp9 transzkripciót gátolva ezzel az iszkémia okozta sejthalál mértékét (11, 12). Eredményeink szintén anti-apoptotikus folyamatokra utalnak a gyors szívingerlést követő késői védőhatásban, mivel mind a BAX mind a Casp3 transzkripciója csökkent az iszkémiás kontrollhoz képest. Több tanulmány igazolta, hogy a késői védőhatás kialakulásáért felelős fehérjék közül az NO szintázok (késői PC-ben elsősorban iNOS), antioxidáns faktorok (MnSOD, CAT), ciklooxygenázok transzkripciója fokozódik (9). Eredményeink azonban csak néhány gén esetében mutattak mRNS szint növekedést (pl. nNOS, HSP70). Ennek egyik oka lehet, hogy ezen gének expressziós változásai már eltűnnek 24 órával a gyors szívingerlés után, és inkább fehérje mennyiségi ill. funkcionális változások járulnak hozzá a késői antiaritmiás védőhatás létrehozásához. Ezért a második célkitűzésben megfogalmazottak alapján megvizsgáltuk a fenti csoportosításban szereplő gének kifejeződésének időfüggését a gyors szívingerlést követő négy időpontnál, közvetlenül utána ill. 6, 12 és 24 óra múlva.

A fenti eredményekből kiderült, hogy gyors szívingerlés hatására az antioxidáns MnSOD, valamint az NO közvetítette jelátviteli útvonalakban fontos szereplők (PKC ϵ , ERK1, sGC α 3, sGC β 3, sGC α 2) ill. anti-apoptotikus és apoptotikus faktorokat kódoló gének (caspase3 and caspase9, BAX) reagálnak először, amely a korai PC-ben való részvételüket támasztja alá. Ezen gének többsége a prekondicionálást követő 24 óra alatt folyamatosan megtartja megváltozott expressziós állapotát, így feltehetően kiemelt szerepük van a késői védőhatás kialakításában. Azon gének esetében, melyek a gyors szívingerlést követő későbbi időpontokban aktiválódtak, mint pl. iNOS, azokat az irodalmi eredményeket támasztja alá, amelyekben kimutatták, hogy a késői védőhatás kialakulásáért a fokozott iNOS transzkripciónak köszönhető, NO termelés felelős (13). Eredményeink alapján azonban nemcsak az iNOS hanem az eNOS expressziója is nőtt, amely szintén hozzájárulhat az NO képződéshez a késői védőhatás alatt. Továbbá az eNOS fehérje szintű vizsgálat eredményei 24 óránál mutattak jelentős növekedést. Ugyanakkor az 1177-es pozícióban foszforilált eNOS szintje, mely enzimaktivitást tükröz, már közvetlenül a prekondicionáló stimulust követően (0 óránál) fokozódott jelentősen majd 24 órával később is, jelezve, hogy az eNOS fontos tényezője az NO termelésnek nemcsak a késői hanem a korai fázisban is. Szintén késői időpontoknál aktiválódott az ingerület vezetésében fontos részeket kódoló Cx43 fehérje génje is. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a gyors szívingerlés hatására kialakult késői PC-ben fontos szerepe van a részeket kódolóknak (14). Gyors szívingerlés után 6 órával csökkent az expresszió, míg 12 óra múlva fokozódott a kontrollhoz képest. Ezeket a változásokat fehérje szinten is megvizsgáltuk, és a Cx43 szintje 12 óránál csökkent majd 24 óránál állt vissza kontroll szintre, jelezve ezzel hogy a génexpressziós változások és fehérje kifejeződésében hasonló irányban, de későbbi időintervallumban változtak (14).

Kísérleteink alapján az alábbi új eredményeket állapíthattuk meg:

- A gyors szívingerlés által kiváltott késői antiaritmiás védőhatás során 23 gén mutatott jelentős expressziós szintű változást, amelyek közül néhány szerepe eddig nem volt ismert (pl. sejtfelszíni receptorok, jelátviteli folyamatok enzimek, anti-apoptotikus faktorok).
- Továbbá 45 vizsgált gén esetében, melyek szerepe ugyan ismert iszkémiás PC-ben, de nincs adat az gyors szívingerléssel kiváltott védőhatásban, 22 mutatott jelentős expressziós szintű

csökkenést vagy növekedést. Ezek között szerepelnek pl. hősokk fehérjék, NO szintézisért felelős enzimek, jelátviteli folyamatok fehérjéi, anti-apoptotikus faktorok).

- A gyors szívingerlést követően a vizsgált 29 gén eltérő expressziós mintázatát azonosítottuk. A különböző funkcióval rendelkező gének különböző időbeni kifejeződést mutattak, melyek összefüggésbe hozhatóak akár a korai akár a késői védőhatás kialakulásával.

Referencia

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-36, 1986.
2. Végh Á, Komori S, Szekeres L, Parratt JR. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetized dogs and rats. *Cardiovasc Res* 26: 487-95, 1992.
3. Végh Á, Szekeres L, Parratt JR. Transient ischaemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 25: 1051-3, 1991.
4. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterization of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: time course and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* 92: 159-67, 1997.
5. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84: 350-6, 1991.
6. Parratt JR, Vegh A, Papp JG. Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning-a brief review of the evidence. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 837-42, 1995.
7. Ferdinándy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 138: 532-543, 2003.
8. Das DK, Maulik N (2006) Cardiac genomic response following preconditioning stimulus. *Cardiovasc Res* 70:254 – 263

9. Bolli R (2000) The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87:972-983.
10. Ónody A, Zvara A, Hackler L Jr, Vígh L, Ferdinandy P, Puskás LG (2003) Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FEBS Lett* 536:35-40.
11. Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, Wilcox JN, Thourani V, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2000) Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 45:661-670. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00393-4
12. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton D, Das DK. (1999) Ischemic preconditioning reduces apoptotosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* 100:11369-11375.
13. Jones WK, Flaherty MP, Tang X-L, Takano H, Qui Y, Banerjee S, Smith T, Bolli R (1999) Ischemic preconditioning increases iNOS transcript levels in conscious rabbits via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 31:1469-1481
14. Gönczi M, Kovács M, Seprényi G, Végh Á (2012) The involvement of gap junctions in the delayed phase of the protection induced by cardiac pacing in dogs. *Clin Sci (Lond)*. 123:39-51.